

NÁVRH PROJEKTU DO VEŘEJNÉ SOUTĚŽE VE VÝZKUMU A VÝVOJI

Programu Výzkum v agrárním komplexu, VAK s počátkem řešení projektů v roce 2009
poskytovatel - MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

Název projektu

Nová strategie hodnocení kvality a autenticity potravinových surovin a produktů živočišného původu v řetězci prvovýroba - spotřebitel

VEŘEJNÁ SOUTĚŽ

Programu Výzkum v agrárním komplexu, VAK s počátkem řešení projektů v roce 2009
PODPROGRAM
UDRŽITELNÝ ROZVOJ AGRÁRNÍHO SEKTORU

Analytická chemie, separace

Potravinářství

Cíl podprogramu - Výzkumný směr

2. Vypracovat nové postupy a posuzování pro produkci a zpracování zemědělských surovin a potravin a zvýšit jejich kvalitu a bezpečnost.

Cíl projektu

Zavést a validovat zcela nové, rychlé metody pro spolehlivé hodnocení kvality a autenticity vybraných surovin a potravin živočišného původu v řetězci prvovýroba - finální spotřebitel založené na metabolomických profilech získaných technikou DART-TOF MS.

Doba řešení

1.6.2009 - 31.12.2013

Projektový tým

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. - příjemce - koordinátor

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze - příjemce

Českomoravský svaz mlékárenský - spolupříjemce

Řešitelský tým - odpovědnost za řešení

Drbohlav Jan Ing. CSc. - odpovědný řešitel

Hajšlová Jana Prof. Ing. CSc. - řešitel

Němec Michal - spoluřešitel

1. IDENTIFIKAČNÍ ÚDAJE PROJEKTU

1.1. ČÍSLO PROJEKTU - podací

VUM08E

1.2. NÁZEV PROJEKTU

Nová strategie hodnocení kvality a autenticity potravinových surovin a produktů živočišného původu v řetězci prvovýroba - spotřebitel

1.3. SPECIFIKACE PROJEKTU

1.3.1. VEŘEJNÁ SOUTĚŽ

VS8MZEVAK0913 - Programu Výzkum v agrárním komplexu, VAK s počátkem řešení projektů v roce 2009

1.3.2. PODPROGRAM

1 - UDRŽITELNÝ ROZVOJ AGRÁRNÍHO SEKTORU

1.3.3.

CB - Analytická chemie, separace

1.3.4.

GM - Potravinářství

1.3.5. Cíl podprogramu - Výzkumný směr

12 - 2. Vypracovat nové postupy a posuzování pro produkci a zpracování zemědělských surovin a potravin a zvýšit jejich kvalitu a bezpečnost.

2. PŘEDSTAVENÍ ŘEŠENÍ PROJEKTU

Základním principem evropské potravinové politiky je vysoký standard kvality a zdravotní nezávadnosti potravin a dále též ochrany spotřebitele a trhu před nekalými praktikami. Pozornost veřejnosti byla v minulosti upoutána zvýšeným výskytem BSE (Bovinní spongiformní encefalopatie), případy použití antibiotik či jiných farmak jako přísad do krmiv ke zvýšení produkční účinnosti hospodářských zvířat nebo výskytem dioxinů v krmivech a následně živočišných produktech. Zmíněné „krize bezpečnosti potravin“ vedly Evropskou komisi k radikální reorganizaci celého systému zajištění bezpečnosti potravin s cílem vytvořit jednotný, funkční systém, zahrnující celý potravní řetězec, od prvovýroby (včetně krmiv) až po spotřebitele. Došlo k vybudování „Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva“ (Rapid Alert System for Food and Feed – RASFF), který představuje síť členských států Evropské unie, Evropské komise a Evropského úřadu pro bezpečnost potravin. Tato systémová opatření projevila svou funkčnost i v nedávné době, kdy ve snaze o falšování mleté papriky byla používána nepovolená syntetická barviva anebo se jednalo dokonce o falšování mléka melaminem, a to s fatálními dopady bezpříkladného rozsahu.

Dané problémy vedou rovněž ke skutečnosti, že si spotřebitelé stále více uvědomují, jaké potraviny konzumují a zesílil i jejich tlak na produkci potravin o vyšší kvalitě. Pro konzumenty se stal důležitý také geografický původ a zemědělská praxe používaná při výrobě potravin, z čehož postupně vyplynuly požadavky na precizní sledování původu a označování potravinářských výrobků.

Evropské společenství zapracovalo ochranu spotřebitelů před falšovanými či nesprávně deklarovanými výrobky do řady svých předpisů. Obecně je tato problematika zahrnuta již do Nařízení č.178/2004/ES (obecné zásady a požadavky potravinového práva) a Nařízení č. 882/2004/ES (o úředních kontrolách). Nově je aplikováno např. Nařízení č.510/2006/ES o ochraně zeměpisných označení a označení původu zemědělských produktů a potravin nebo Nařízení č. 1216/2007/ES kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 509/2006 o zemědělských produktech a potravinách, jež představují zaručené tradiční speciality. Dalšími právními předpisy jsou podrobně upravovány požadavky na autenticitu lihovin, vín, druhů olivových olejů apod. Český zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách výslovně zakazuje uvádět do oběhu potraviny klamavě označené. Za takové potraviny se přitom pokládají ty, které neodpovídají složením, názvem nebo údaji uvedenými na obale potraviny.

Speciálním případem deklarace původu potraviny jsou biopotraviny a bioprodukty, které se primárně odlišují od ostatních potravin stejného druhu pouze podmínkami produkce. Nicméně v podmínkách ekologického zemědělství lze předpokládat především u živočišných produktů (maso, mléko) jisté odlišnosti ve složení (například lipidů), které jsou dané zejména rozdíly v krmení. Pro zajištění korektní hospodářské soutěže a fungování evropského trhu s ekologickými produkty a dále pro zachování důvěry spotřebitelů v produkty označené jako ekologické, vchází v platnost od ledna 2009 Nařízení ES č. 834/2007/ES, které mimo jiné zpřísňuje požadavky na kontrolu a certifikaci bioproduktů, analytické nástroje pro kontrolu původu biopotravin však dosud chybí.

Na ochranu trhu a spotřebitele před falšováním byly v minulosti vyvinuty poměrně účinné kontrolní metody především pro víno, lín a lihoviny, ovocné šťávy, kávu a rostlinné oleje. V posledních letech se pozornost stále více přesouvá na masné a mléčné výrobky, kde je často poměrně úzká hranice mezi maximálním využitím moderních technologických možností v rámci platné legislativy a již nepovoleným "vylepšením" daného produktu. Výrobci zde často zneužívají také skutečnosti, že se v mnoha případech jedná o neúdržné potraviny s krátkou dobou spotřeby a konvenční laboratorní testy bývají poměrně zdoluhavé a provozně nákladné. Prioritní pozornost však zasluhuje problematika falšování právě masných a mléčných výrobků především proto, že ve spotřebním koši české populace zaujímají - na rozdíl například od vína, lihovin či čokolády - zcela dominantní postavení.

Mezi hlavní způsoby falšování lze uvést: (i) náhrada nákladné suroviny za levnou, (ii) použití jiné než deklarované technologie, (iii) maskování nedodržení receptury, (iv) nesprávné uvedení místa původu, (v) zneužití známé značky.

V rámci navrhovaného projektu se předpokládá zaměření na vybrané komodity živočišného původu: (i) mléko a mléčné výrobky a (ii) maso a masné výrobky.

Mléko a mléčné výrobky

Mléko a mléčné výrobky jsou základní složkou výživy celé populace včetně malých dětí. Jejich falšování proto vykazuje významný ekonomický ale i zdravotní aspekt. Metody detekce falšování mléka a mléčných výrobků používané v současnosti jsou dostačující v případech, kdy dochází k změnám v hlavních složkách sušiny např. zvodnění mléka nebo nižší obsah tuku ve výrobku než výrobce deklaruje. Současným problémem je však nahrazování dražších surovin za levnější. Jedná se především o záměnu dražšího ovčího a koziho mléka kravským mlékem, a to jak u mléka, tak u celé řady mléčných výrobků.

Tento způsob falšování představuje vzhledem k možné alergii na kravské mléko výrazné riziko. Dosavadní analytické metody používané pro průkaz různých druhů mléka zahrnují: elektroforetické a chromatografické metody pro separaci kaseinů, imunochemické metody identifikace jednotlivých fragmentů bílkovin a imunoglobulinů kravského mléka, metody založené na PCR a spektroskopické metody v blízké infračervené oblasti (NIR). Již sama existence takového množství používaných metod naznačuje, že dosud není dostupná rychlá a univerzálně použitelná metoda pro průkaz různých druhů mlék v mlékarenských výrobcích. Hlavní nevýhodou používaných metod je sledování jednoho vybraného markeru, který může v průběhu technologického zpracování degradovat (např. deaktivace imunoglobulinů při UHT záhřevu) a proto jsou tyto metody použitelné vždy jen na úzkou skupinu výrobků.

Další způsob falšování mléka představuje nedeklarované nahrazování mléčného tuku ve výrobcích (zejména sýrech) rostlinnými oleji. Metody detekce cizího tuku v mléčném jsou založeny na sledování zastoupení mastných kyselin, sterolů a TAG tuku. Využití detekce rostlinných sterolů se ukázalo jako nevhodné z důvodů závislosti jejich koncentrace na technologickém zpracování. Detekce na základě zastoupení mastných kyselin naráží na problémy se značnou sezonní variabilitou v jejich složení a proto je nevhodná pro průkaz nízkého přídavku cizích tuků. Stejně tak je tomu i u detekce TAG ze které vychází Nařízení komise (ES) č. 273/2008, kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 1255/1999, pokud jde o metody analýzy a hodnocení jakosti mléka a mléčných výrobků. V poslední době, kdy stoupá u spotřebitelů poptávka po potravinách produkovaných v podmínkách ekologického zemědělství, vyvstává vzhledem k výrazně vyšší ceně bio mléka potřeba zamezit jeho cílenému zaměňování z běžným konvenčně produkovaným mlékem. V současnosti neexistuje metoda schopná rozlišit mléko pocházející z bio chovu. Pro takový průkaz je třeba využít metod, které sledují velké množství parametrů a tím poskytují účinný nástroj pro využití chemometrických nástrojů k rozlišení jednotlivých surovin.

Nové multidetekční metody jako je např. hmotnostní spektrometrie s desorpční ionizací za atmosférických podmínek (DART-TOFMS) mohou být cestou jak zajistit okamžitou analýzu, která na základě složení spektra metabolomů poskytne informace o původu použité suroviny a tím mohou poskytnout účinný nástroj pro kontrolu mléka a mléčných produktů. Právě detekce širokého spektra metabolomů je možné využít pro nahrazení celé řady časově i finančně náročných analytických metod používaných pro výše uvedené typy falšování mléka a mléčných výrobků.

Literatura:

- Fontech J., Mayo I., Toledano G., Juárez M.: Use of changes in triacylglycerols during ripening of cheeses with high lipolysis levels for detection of milk fat authenticity. *International Dairy Journal* 16, (2006) 1498–1504
- Asensio L., González I., García T., Martín R.: Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19 (2008) 1–8
- I. González-Martín, J.M. Hernández-Hierro, R. Morón-Sancho, J. Salvador-Esteban, A. Vivar-Quintana, I. Revilla: Determination of the percentage of milk (cow's, ewe's and goat's) in cheeses with different ripening times using near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe. *Analytica chimica acta*, 604 (2007) 191–196
- I. López-Calleja, I. González, V. Fajardo, I. Martín, P.E. Hernández, T. García, R. Martín: Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control*, 18 (2007) 1466–1473
- D.M.A.M. Luykx, J.H.G. Cordewener, P. Ferranti, R. Frankhuizen,

- M.G.E.G. Bremer, H. Hooijerink, A.H.P. America: Identification of plant proteins in adulterated skimmed milk powder by high-performance liquid chromatography—mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1164 (2007) 189–197
- R.G. Crittenden, A.S. Andrew, M. LeFournour, M.D. Young, H. Middleton, R. Stockmann: Determining the geographic origin of milk in Australasia using multi-element stable isotope ratio analysis. *International Dairy Journal* 17 (2007) 421–428
- F. Destailats, M. de Wispelaere, F. Joffre, P. Golay, B. Hug, F. Giuffrida, L. Fauconnot, F. Dionisi: Authenticity of milk fat by fast analysis of triacylglycerols Application to the detection of partially hydrogenated vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 1131 (2006) 227–23
- I.P. Hurley, R.C. Coleman, H. E. Ireland, J.H.H. Williams: Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese. *International Dairy Journal*, 16 (2006) 805–812
- L.M. Reid, C.P. O'Donnell, G. Downey: Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (2006) 344–353
- A.C.A. Veloso, N. Teixeira, A.M. Peres, A. Mendonca, I.M.P.L.V.O. Ferreira: Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea–polyacrylamide gel electrophoresis. *Food Chemistry*, 87 (2004) 289–29
- I.M.P.L.V.O. Ferreira, H. Caçote: Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *Journal of Chromatography A*, 1015 (2003) 111–118

Maso a masné výrobky

V případě masa je kvalita dána vedle intravitálních vlivů především dobou a průběhem postmortálních změn (zrání) na straně jedné, čerstvostí na straně druhé. Posmrtné děje jsou vedle počátečního okyselení vytvářenou kyselinou mléčnou charakterizovány především vlastními enzymy způsobenou proteolýzou kdy dochází k tvorbě řady sensoricky aktivních látek jako jsou oligopeptidy (karnosin, anserin, balenin, glutathion), aminokyseliny. Vedle toho se přeměňují přítomné nukleotidy na chuťově významné produkty (inosin, hypoxantin, xantin, aj.). Zrání masa musí být dostatečně dlouhé na to, aby byla zajištěna jeho dobrá textura (křehkost) a vytvořila se plná chutnost. Identifikace změnových poměrů u proteinů i lipidů a jejich degradačních produktů může působit jako efektivní faktor k určení zracích pochodů a optimální jakosti masa. Doposud neexistují spolehlivé operativní metody, které by vytvoření takových složek umožnily.

Na druhou stranu může docházet ke znehodnocení masa činností mikroorganismů (především bakterií), která je charakterizována (vedle přímého nárůstu patogenů) destrukcí proteinů a jiných složek masa za vzniku zdravotně závadných složek (biogenní aminy) a sensoricky nežádoucích složek (aminy, amoniak, sulfan, skatol, indol atd.). důležitý parametr kvality jeho čerstvost. Rovněž obsah lipidů podléhá v časovém sledu změnám ve složení masa a dochází k tvorbě degradačních produktů, které mohou negativně ovlivnit kvalitu masa.

Maso podléhá ihned po porážce postupnému působení mikroorganismů v závislosti na řadě faktorů (kontaminace, průběh postmortálních změn, povrchové ošetření dodržení chladicího řetězce. Klasické mikrobiologické (eventuálně orientační chemické) metody pro zjištění čerstvosti masa bývají málo operativní a poskytují informaci s velkým

zpožděním. Naproti tomu v praxi je většinou je třeba rychle rozhodnout o dalším použití masa.

Falšování masa

Maso jakožto cenná potravina je samozřejmě objektem možného falšování. Může docházet k záměně masa různých živočišných druhů, záměně pohlaví, způsobu chovu i ošetření při skladování.

K záměně mas různých živočišných druhů dochází zejména záměnou drahého masa masem levnějším. Může se tak zaměňovat relativně drahé maso hovězí levnějším masem vepřovým, event. koňským, zvěřina může být částečně či zcela nahrazována masem domestikovaných zvířat (maso černé zvěře vepřovým, maso jelenovitých masem hovězím, muflon skopovým apod.). Vedle pouze ekonomických aspektů lze při záměně porušit i náboženská, ekologická či legislativní omezení. Týká se to např. nepovolené konzumace vepřového masa pro židovské a muslimské komunity či konzumace ohrožených živočišných druhů (kytovci, lidoopi, medvědi apod.). V případě intaktního masa lze do jisté míry subjektivně odhadnout druh podle barvy, tvaru svalů či struktury masa, což však již není možné u mletého masa či masových směsí. Vedle záměny úmyslné ve smyslu falšování může jít i o pouhý omyl v masné výrobě záměnou (např. krůtího masa a vepřového či skopového a hovězího).

Maso zvířat různého pohlaví či věku se liší z hlediska kvality, v některých případech je maso nepoužitelné (kančí pach – viz dále). V případě skotu je považováno za kvalitní maso mladých býků, zatímco maso krav (které jsou s ohledem na potřebu získání několika telat výrazně starší) horší, bývá tučnější, má více kolagenu s příčnými vazbami (crosslinks), a tudíž tužší. Nej kvalitnější bývá maso volků, kteří mají více intramuskulárního tuku a jejichž maso je křehčí. Protože i zde platí ekonomika chovu a jsou rozdílné ceny, je záměna jednotlivých pohlaví důvodem k falšování, zejména prodej kravského masa místo masa býčího. Dosavadní analýzy, které využívají např. PCR, jsou drahé (viz výše).

Velký problém představuje vliv pohlaví u vepřového masa. Zatímco maso vepřů (tj. kastrátů) a prasniček je bez problémů, kančí maso má nepříjemný „kančí pach“ způsobený samčím hormonem androstenonem, který způsobuje vnímavost konzumenta ke skatolu. Vzhledem k tomu, že produkce nekastrovaných kanečků je ekonomicky výhodná, dostává se tak do protikladu ekonomika a kvalita masa. Problém se řeší jak geneticky, tak i porážením kanečků v nižším věku, kdy se ještě vliv samčích hormonů na tento pach neprojeví. Je však vždy potřeba eventuelní sklon k produkci tohoto pachu a u konkrétního jedince a jeho přítomnost v JUT kontrolovat. V případě konkrétního masa je třeba operativně rychle rozhodnout o jeho dalším možném použití. Doposud se používá chromatografických metod (GLC, HPLC) vzorku tukové tkáně.

V poslední době se velká pozornost věnuje biopotravínám a masu pocházejícímu z ekologických chovů. Často jde jen o filosofický pohled na jiný životní styl bez důkazu, že biopotraviny jsou kvalitnější či rozdílné. Je proto třeba vysledovat, zda a jak se liší maso z biochovu oproti masu z konvenčních chovů a nalézt markery, jak dokázat, že jde o skutečně o „biomaso“, a zabránit tak možným záměnám, které (s ohledem na výrazně vyšší cenu biopotraviny) lze očekávat.

K falšování dochází i záměnou čerstvých a zmražených živočišných potravin. Nejčastěji se to týká ryb, které jsou po mrazírenském skladování a rozmražení vydávány za čerstvé, toto falšování se však i týká kvalitních částí svaloviny velkých jatečných zvířat určených pro prodej ke kulinární úpravě. Dosavadní analýzy, které mají takové záměny rozlišit vycházejí ze skutečnosti, že zmrazením se poškodí buněčné organely, uvolní se některé enzymy, jejichž přítomnost je důkazem zmražení. Metody jsou časově (několik hodin) i finančně náročné (např. set na několik desítek analýz stojí cca 15 000 Kč.) a do značné míry nespolehlivé, protože mohou poskytnout pouze pozitivní důkaz. Absence

přítomného enzymu může znamenat jak to, že je maso čerstvé, tak i skutečnost, že u zmraženého masa došlo při skladování ke ztrátě aktivity těchto enzymů (např. denaturací, oxidací...).

Stejný analytický důkaz může být použit i pro ověření, zda bylo zmrazeno maso tam, kde je ošetření zmražením a rozmražením výhodné z hlediska zvýšení jistoty, že v mase nebudou někteří paraziti (toxoplazma, trichinela). Týká se to některých tepelně neopracovaných výrobků (čajovka) nebo výrobků konzumovaných bez tepelné úpravy (tatarský biftek, syrové vepřové maso).

Současné metody pro detekci falšování potravin jsou založeny na fyzikálních zkouškách, chemických analýzách, případně vyšetření imunochemickými či mikroskopickými technikami.

Nejčastější jsou v praxi postupy, kdy se vyhodnocuje podíl jednotlivých komponent charakteristických pro daný druh výrobku (například zastoupení mastných kyselin v tuku). Často postačí identifikace jediné látky (markeru), která je pro daný druh typická a v jiné surovině se nevyskytuje. Chemická analýza také často využívá pro určování původu některých potravin poměrného zastoupení jednotlivých chemických prvků, resp. jejich izotopů.

Poměrně komplikované (ale velmi aktuální) zůstává například určování původu masa v masných výrobcích. Příslušné metody identifikace druhově specifických komponent zahrnují jak metody imunologické, tak i metody založené na analýze tuků, případně též metody histologické či metody molekulární genetiky. Metody molekulární genetiky jsou založeny na analýze nukleových kyselin odolných vůči tepelnému zpracování surovin. Pro identifikaci původu masa se využívá definovaného úseku mitochondriálního genu pro cytochrom b eukaryotických buněk obratlovců (PCR a PCR-RFLP, Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism).

V oblasti chemické analýzy se s rozvojem instrumentace stále více k charakterizaci potravin uplatňují metody profilování s následným matematicko-statistickým zpracováním obsáhlých dat.

Fingerprinting / profilování využívá výstup z různých multidetekčních analytických technik, například spektroskopie nebo chromatografie. Provozním předpokladem je, že ačkoli tyto techniky zaznamenávají informace o potravinových složkách neselektivním způsobem, matematická manipulace s daty umožňuje vytvoření charakteristického signálu nebo „fingerprintu“, který je pro každou potravinu jedinečný. V praxi vzniká značný rozsah proměnlivosti v signálech zaznamenaných pro jednotlivé potraviny z přirozeně se vyskytujících příčin jako jsou např. počasí při sklizni, vliv odrůdy, odchylky při zpracování atd. Proto je k vývoji přesných metod pro jakoukoli danou potravinu nezbytné použít vzorový soubor o dostatečné velikosti, který by zahrnoval reprezentativní úroveň odchylek od příslušných zdrojů. Tímto způsobem mohou být chemometrické metody použity k charakterizaci autentických potravin s vysokým stupněm přesnosti a umožnit detekci falšovaných nebo jinak netypických nebo změněných potravin.

V tomto projektu bude navržena a validována zcela nová strategie zjišťování původu vybraných potravin živočišného původu a jejich nutričně významných složek (např. tuků) na základě statistického zhodnocení souboru výsledků experimentů zaměřených na zaznamenání charakteristických metabolomů, resp. vhodných markerů původu suroviny. Pro velmi rychlé, komplexní a spolehlivé vyšetření velkého počtu potřebných vzorků bude využita unikátní měkká ionizační technika vzorkování složek matrice přímo z jejich povrchu - DART (Direct Analysis in Real Time). Jedná se o přímou hmotnostní spektrometrii (TOF-MS) s ionizací typu APCI (atmospheric pressure chemical ionization) v

otevřené atmosféře. Minimální nároky na přípravu vzorků potravin pro vlastní měření, prakticky okamžitý výstup a relativně nízké provozní náklady patří k hlavním přednostem techniky DART pro její uvažované využití v kontrolní praxi.

Literatura:

Kelly, S., Heaton, K. & Hoogewerff, J.: Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (2005) 555-567

Obrovská I., Steinhauserová I., Nebola M., Krkoška L.: Identifikace druhů masa v masných výrobcích. *Veterinářství*, 52 (2002) 421-423

Vaz-Freire L.T., et al., Comprehensive two-dimensional gas chromatography for fingerprint pattern recognition in olive oils produced by two different techniques in Portuguese olive varieties. *Anal. Chim. Acta* (2008), doi:10.1016/j.aca.2008.11.057

Cajka T., Hajslova J., Pudil F., Riddellova K.: Traceability of honey origin based on volatiles pattern processing by artificial neural networks, *J. Chromatogr. A* (2008), doi:10.1016/j.chroma.2008.12.066

Cooks R.G., Ouyang Z., Takats Z., Wiseman J.M., *Detection Technologies. Ambient mass spectrometry. Science*, 311 (2006) 1566-1570.

Wishart D.S. *Metabolomics: application to food science and nutrition research. Trends in Food Sci Technol.*, 19 (2008) 482-493.

Diaz O., Veiga, A., Ros C., Cobos A.: Application of an enzymic method for the differentiation of fresh and frozen-thawed pork, *Alimentaria* 339, 2002 c. 39: s. 25-28, ISSN 0300-5755

Duflos, G. Fur, B. Mulak, V. Becel, P. Malle, P.: Comparison of methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish or fillets. *Journal Sci. Food Agr.* 2002 82(12): 1341-1345

Ryby a rybí výrobky

Ryby tvoří významnou část jídelníčku a v poslední době se na stůl spotřebitelů dostávají stále častěji v souvislosti se snahou části populace o zdravější způsob života. Jsou významným zdrojem mj. vitaminů, minerálů, stopových prvků a nenasycených mastných kyselin S tím souvisí nutnost zajistit pestrou nabídku kvalitních nezávadných ryb jedná se o komoditu, která je velmi náročná na skladovací a transportní podmínky a udržení čerstvosti.

Působením mikroorganismů může dojít k rozkladu bílkovin a dalších složek rybího masa a vzniku nežádoucích látek – biogenních aminů (histamin aj.), alergenů, bakteriálních toxinů, amoniaku amoniak je indikátorem čerstvosti ryb. Dále je zde nebezpečí kontaminace patogenními mikroorganismy a jejich nárůstu. Všechny tyto nežádoucí mikroorganismy je možné detekovat klasickými mikrobiologickými kultivačními metodami, ostatní látky chemickými kvalitativními nebo kvantitativními metodami (titrační, destilační, HPLC, elektrometrické a další). Společným jmenovatelem těchto metod je většinou dlouhý čas, nutný k získání výsledku, který umožňuje o surovině rozhodnout tyto metody nenabízejí rychlé posouzení čerstvosti. Často je ovšem nutné rychle rozhodnout o dalším použití rybího masa.

Ryby a rybí výrobky jsou velmi cenné, existují levnější a velmi drahé druhy ryb. Zde může docházet ke snahám o falšování ryb a výrobků z nich, které se zaměřuje zejména na záměny dražších ryb za levnější druhy, přídavek aditiv do rybího masa zejména za účelem

vázaíni vody, pñídavek látek s obsahem dusíku za účelem falešného zvýšení obsahu rybího masa, použití zakázaných barviv, snahu o prodej výrobků po lhůtě spotřeby. Falšováním je také záměna chlazených a mražených ryb, zde může dojít ke zmrazení chlazených ryb a jejich opětovnému rozmrazení, případně rozmrazení zmrazených ryb a jejich vydávání za čerstvé. Stávající metody průkazu zmrazení a následného rozmrazení masa jsou časově i finančně náročné.

Cílem projektu na tomto úseku je navrhnout novou metodu pro zjišťování čerstvosti a jakosti ryb. Hlavními požadavky na tuto metodu jsou rychlost, spolehlivost, možnost vyšetření velkého množství vzorků. Bude využita ionizační technika vzorkování složek matrice z povrchu – Direct Analysis in Real Time (DART) – hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací (MS-TOF/APCI). Při použití této techniky odpadá náročná příprava vzorku a náklady na tuto přípravu jedná se o rychlou a relativně levnou metodu pro využití při kontrole potravin kontrolními organizacemi (SVS, SZPI).

3. RÁMEC PROJEKTU

3.1. POSLÁNÍ PROJEKTU

3.1.1. Definice účelu projektu

Zajištění efektivní ochrany spotřebitelů, ale i výrobců potravin před falšovanými či nesprávně značenými výrobky či surovinami je významným úkolem ve všech vyspělých zemích. V souladu s předpisy Evropského společenství, také česká legislativa resp. zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách výslovně zakazuje uvádět do oběhu potraviny klamavě označené, t.j. takové, které neodpovídají složením, názvem nebo údaji uvedenými na obale potraviny.

Uvedené požadavky jsou bohužel v praxi dosti často porušovány, v řadě případů vedle ekonomických ztrát dochází i k ohrožení zdraví konzumentů. Dramatickým příkladem zdravotních dopadů na širokou skupinu populace je falšování mléčných výrobků resp. obsahu proteinů v nich melaminem. Závažnou konsekvencí falšování je i přítomnost nedeklarované alergenní komponenty v daném výrobku.

Reálně hrozící krize důvěry konzumentů v kvalitu a bezpečnost potravin nastoluje mimo jiné i naléhavou potřebu kontroly dodržování principů sledovatelnosti (traceability) v řetězci provozy výroba - zpracovatelská / distribuční sféra - spotřebitel. I když postupné zavádění moderních (bio)analytických postupů do dozorových i privátních laboratoří významným způsobem rozšířilo spektrum hodnocených jakostních ukazatelů a zvýšilo úroveň získávaných dat, laboratorní průkaz falšování zůstává v řadě případů složitým problémem a může vyžadovat provedení řady komplementárních testů. Je nutné konstatovat, že v mnoha případech spolehlivé mezilaboratorně validované postupy dosud nejsou k dispozici buď vůbec, nebo jsou velmi drahé či časově náročné. Příkladem může být rozlišení bioproduktů od produktů z konvenčního zemědělství či odhalení zcela nového, mnohdy velmi sofistikovaného postupu zvýšení profitu daného provozovatele potravinářského podniku.

V roce 2005 byly popsány a v následujícím roce uvedeny na trh revoluční typy iontových zdrojů pro hmotnostní spektrometrii (mass spectroscopy, MS), které umožňují vyšetřování různých matic (kapalných, pevných i plyných) v otevřeném prostoru.

Příprava vzorků pro analýzu buď není vůbec nutná nebo je jen minimální. Pracoviště VŠCHT se stalo v roce 2008 jedním z prvních v Evropě, které začalo testovat aplikační potenciál jedné z těchto unikátních technik - iontový zdroj "Direct Analysis in Real Time" (DART) spojený s hmotnostním spektrometrem s analyzátozem doby letu iontů (Time of the Flight, TOF). Již první výstupy naznačily vysokou diagnostickou hodnotu naměřených metabolomických profilů ("fingerprintů") pro posuzování kvalitativních i kvantitativních parametrů vzorků. Tato zcela nová technika otevřela mimořádnou možnost zásadně zrychlit a zefektivnit vyšetřovací strategii v řadě oblastí.

Účelem tohoto projektu je vypracování metodik pro zajištění kvality a autenticity (odhalení/zabránění falšování) vybraných potravinových surovin a produktů živočišného původu v řetězci prvovýroba - spotřebitel.

3.1.2. Očekávané přínosy projektu

Motivační účinek podpory z veřejných zdrojů se projeví v zavedení rychlých a provozně nenáročných metod pro zjištění kvality a autenticity (i) mléka, mléčných výrobků, (ii) masa a masných výrobků, (iii) ryb a výrobků z nich.

Novou vyšetřovací strategii využívající unikátní techniku DART-TOF MS bude možné genericky aplikovat i pro řadu jiných matric jako jsou krmiva či potraviny rostlinného původu. Uživatelé výstupů projektu budou jak kontrolní laboratoře zodpovědné za státní dozor nad kvalitou a bezpečností potravin, tak i pracoviště privátního sektoru, která jsou často konfrontována s potřebou dokumentovat autenticitu surovin a výrobků, tuzemské či zahraniční provenience.

Výsledky projektu budou bezesporu iniciovat navazující výzkum vedoucí k dalším aplikacím v agrární a potravinářské sféře. Za předpokladu dostupných databází spektrálních profilů metabolomu bude možné detekovat odlišnosti mezi "běžnými" vzorky a vzorky neznámými, což mimo jiné může umožnit i zjištění teroristického útoku na potraviný řetězec realizovaný toxickými sloučeninami či použitím jiné toxické chemikálie (jako byl např. dříve zmiňovaný melamin).

Z obecného pohledu je přínosem projektu ochrana ekonomických zájmů společnosti (trhu), posílení důvěry konzumentů v jakost a bezpečnost potravin a potažmo ochrana zdraví populace. S ohledem na potenciál uvažované techniky lze předpokládat i využití i v zahraničí - na základě výstupů publikovaných v impaktovaných časopisech.

3.1.3. Způsob ověření dosažených přínosů

(i) využití metodik předpokládanými uživateli a event. připomínkami k těmto metodikám
(ii) citovaností vědeckých publikací

Na tomto místě je nutné zdůraznit, že implementace diskutované techniky na řadě pracovišť nevyžaduje významnou investici neboť cenově relativně dostupný iontový zdroj DART lze nainstalovat i na stávající (podstatně dražší) hmotnostní spektrometry, kterými je řada pracovišť potenciálních uživatelů již vybavena.

3.1.4. Kritické předpoklady dosažení účelu projektu

Kritické předpoklady dosažení účelu projektu jsou takové nepředvídatelné události jako je zrušení řešitelských pracovišť, fatální selhání instrumentace, nedostupnost plánovaných vzorků.

3.2. CÍL PROJEKTU

3.2.1. Definice cíle projektu

3.2.1.1. Co má být projektem dosaženo

Zavést a validovat zcela nové, rychlé metody pro spolehlivé hodnocení kvality a autenticity vybraných surovin a potravin živočišného původu v řetězci prvovýroba - finální spotřebitel založené na metabolomických profilech získaných technikou DART-TOF MS.

3.2.1.2. Do jakého data bude dosaženo cíle

31.12.2013

3.2.1.3. Datum zahájení řešení

1.6.2009

3.2.2. Výsledky projektu

- (i) Implementace inovativní techniky DART-TOF MS (hmotnostní spektrometrie s desorpční ionizací za atmosférických podmínek) jako nástroje vyšetření metabolomu mléka, masa, ryb a výrobků z nich.
- (ii) Statistické zhodnocení databáze metabolomických profilů (hmotnostních spekter) získaných proměřením souboru definovaných vzorků vybraných potravinových surovin a produktů živočišného původu.
- (iii) Kritické zhodnocení aplikačního potenciálu optimalizované techniky pro kontrolu legislativních požadavků na kvalitu a autenticitu včetně srovnání se stávajícími rutinními postupy (při zohlednění pracovních charakteristik, rychlosti resp. průsaznosti, ekonomických aspektů apod.).
- (iv) Metodické poznatky a standardní operační postupy využitelné pro diskutovaný účel v praxi.

3.2.3. Forma zpracování a předání výsledků

- (i) Obhájená závěrečná zpráva projektu.
- (ii) Vědecké publikace v recenzovaných imapktovaných časopisech.
- (iii) Certifikované metodiky (N).

3.2.4. Kritické předpoklady dosažení cíle

V obecné rovině jsou kritickými předpoklady dosažení cíle nepříznivé agrárně-politické a tržní podmínky (administrativní zásahy a opatření, jako je likvidace experimentálních pracovišť a pod.).

3.3. DÍLČÍ CÍLE ŘEŠENÍ - přehled

V001

1.6.2009 - 31.12.2012 - Standardní

Zajistit různé druhy mlékárenských surovin (mléko kravské, ovčí, kozí) pro technologické experimenty, charakterizovat základní chemické ukazatele jakosti.

V002

1.6.2009 - 31.12.2012 - Standardní

Zajistit a charakterizovat vzorky kravského mléka produkovaného za definovaných podmínek: (i) konvenčním způsobem a (ii) na ekologické farmě (bio surovina). Získat základní kvalitativní ukazatele u obou typů vzorků v průběhu produkčního období.

V003

1.1.2010 - 31.12.2013 - Výzkumná a/nebo experimentální vývojová činnost

Navrhnout receptury a připravit vybrané mléčné výrobky simulující falšování a na základě jejich vyšetření zhodnotit potenciál konvenčních metod jeho průkazu.

V004

1.6.2009 - 31.12.2012 - Výzkumná a/nebo experimentální vývojová činnost

Vyvinout a aplikovat inovativní metodu využívající hmotnostní spektrometrii s desorpční ionizací za atmosférických podmínek (technika DART-TOF MS) pro sledování metabolomických profilů mléka a mléčných výrobků.

V005

1.1.2010 - 31.12.2013 - Výzkumná a/nebo experimentální vývojová činnost

Vybrat a aplikovat vhodné chemometrické nástroje pro autentikaci mléka a mléčných výrobků na základě metabolomických profilů získaných pomocí techniky DART-TOF MS

V006

1.6.2009 - 31.12.2012 - Standardní

Zajistit různé druhy masa (hovězí, vepřové, koňské) pro sledování druhových rozdílů, rozdílů pohlaví i čerstvosti. Získat hovězí maso produkované v konvenčních chovech a bio chovech.

V007

1.1.2010 - 30.12.2013 - Výzkumná a/nebo experimentální vývojová činnost

Navrhnout receptury a připravit vybrané masné polotovary a výrobky simulující falšování a na základě jejich vyšetření zhodnotit potenciál současných metod jeho průkazu.

V008

1.6.2009 - 30.12.2013 - Výzkumná a/nebo experimentální vývojová činnost

Zajistit odběry vzorků ryb. Navrhnout postup pro kvalitativní rozlišení ryb čerstvých (ledovaných), chlazených a zmražených/rozmražených.

V009

1.6.2009 - 31.12.2012 - Výzkumná a/nebo experimentální vývojová činnost

Vyvinout a aplikovat inovativní metodu využívající hmotnostní spektrometrii s desorpční ionizací za atmosférických podmínek (technika DART-TOF MS) pro sledování metabolomických profilů masa, masných výrobků a ryb.

V010

1.1.2010 - 31.12.2013 - Výzkumná a/nebo experimentální vývojová činnost

Vybrat a aplikovat vhodné chemometrické nástroje pro autentikaci masa a masných výrobků na základě metabolomických profilů získaných pomocí DART-TOF MS. Využít tuto techniku k posouzení čerstvosti masa a ryb.

V011

1.1.2013 - 31.12.2013 - Výzkumná a/nebo experimentální vývojová činnost

Kriticky zhodnotit všechny výsledky získané pomocí nové strategie hodnocení kvality a autenticity ve vztahu ke konvenčním metodám. Specifikovat provozní charakteristiky a přednosti, předat validované metodiky uživatelům.

4.2. PROJEKTOVÝ A ŘEŠITELSKÝ TÝM

4.2.1. Představení týmu

Jde o interdisciplinární projekt. K řešení uvedených cílů uvedených v části 3 projektu, vzhledem ke komplexnosti řešení se vytvořil projektový tým tří organizací, které jsou schopny vytčené cíle dosáhnout. Byly navázány kontakty i předpokládanými uživateli výstupů projektu - Státním veterinárním ústavem (SVÚ) v Praze a Jihlavě a Státní zemědělskou a potravinářskou inspekci (SZPI) - s laboratořemi v Praze a Brně.

VÚM s.r.o. - koordinátor

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. má zkušenosti v řešení výzkumných projektů zabývajících se především výzkumem a vývojem v oblasti složení mléka a mléčných výrobků, nových metod ke stanovování chemických, mikrobiologických, fyzikálních a fyzikálně chemických a sensorických parametrů a jejich vlastností. Zabývá se také výzkumem vlivu mléka a mléčných výrobků na výživu člověka, změnami jejich vlastností působením vlivu zpracování a skladování, výzkumem nových způsobů zpracování mléka a výrobou nových výrobků.

ČMSM – spolupříjemce koordinátora

Českomoravský svaz mlékárenský je zájmová organizace registrovaná u Ministerstva vnitra, sdružující právnické i fyzické osoby z oblasti mlékařství včetně mlékáren. Při řešení projektu bude tento uchazeč spolupracovat při komunikaci s mlékařskými subjekty, zajišťovat odběry mléčných vzorků a pomáhat při přenosu získaných poznatků do praxe.

VŠCHT - příjemce

Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc. patří mezi specialisty na otázky bezpečnosti potravin. Je členem mezinárodních pracovních skupin včetně FAO/WHO, technickým vedoucí akreditované laboratoře č.2295 dle ISO 17025:2005 u ČIA. Je reprezentantem ČR v programovém výboru pro 7. Rámcový Program EU. Další odborné aktivity: člen WHO, member of Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR), člen Subcommitte for the Analytical Quality Assurance, GEMS/Food EURO, člen Internacional Association of Environmental Analytical Chemistry, člen výboru Chemické společnosti - pracovní skupina pro potravinářskou a agrikulturní chemii, předseda Komise pro analýzu potravin pro Odboru výživy obyvatelstva a jakosti potravin ČAZV a předseda Technické komise pro chemické analýzy Technického výboru pro zkušební laboratoře při Českém institutu pro akreditaci.

Ing. Tomáš Čajka (asistent) se věnuje aplikaci pokročilých hmotnostně spektrometrických technik ve spojení s plynovou chromatografií (GC-MS) a s desorpční ionizací za atmosférických podmínek (DART-TOFMS) v analýze potravin pro účely detekce kontaminujících látek a autentikaci/profilování různých potravinářských komodit. Dále se věnuje aplikaci chemometrických metod (např. analýza hlavních komponent, lineární diskriminační analýza, umělé neuronové sítě) pro interpretaci dat získaných pomocí moderních instrumentálních technik.

Ing. Lukáš Václavík (student postgraduálního studia) se věnuje aplikaci pokročilých hmotnostně spektrometrických technik v analýze potravin pro účely detekce kontaminujících látek a autentikaci/profilování různých potravinářských komodit.

Doc. Ing. Vladimír Kocourek, CSc. (manažer kvality zkušební laboratoře VŠCHT Praha) se zabývá mimo jiné sledováním vlivu znečištění životního prostředí na kvalitu a nezávadnost potravin a dále implementací legislativních požadavků na potraviny a potravinové suroviny do zkušební a kontrolní praxe. Je spoluřešitelem projektů NAZV a evropských projektů 6. a 7. RP (viz 4.2.2)

Ing. Monika Tomaniová, Ph.D. se věnuje sledování zátěže potravin a složek životního prostředí organickými kontaminanty a vývoji analytických postupů pro jejich stanovení. Dále se věnuje problematice autenticity a sledovatelnosti původu potravin.

Prof. Ing. Petr Pipek, CSc. patří mezi specialisty na otázky technologie a hodnocení jakosti masa a masných výrobků. Zabývá se především změnami masa a masných výrobků při výrobě, skladování a distribuci a vlivem surovin a aditivních a technologie na kvalitu masných výrobků. Byl řešitelem či spoluřešitelem projektů v rámci NAZV, GAČR či MPO realizovaných ve spolupráci s VÚP Praha a s ČZU v Praze. V rámci mezinárodní spolupráce udržuje trvalý kontakt s pracovištěm Okayama University (Japonsko), Spolkovým ústavem pro výzkum masa v Kulmbachu (SRN) a STU Bratislava, byl spoluřešitelem mezinárodních projektů Leonardo. Dlouholetá spolupráce s podniky masného průmyslu při řešení aktuálních problémů technologie a udržitelnosti masa.

Ing. Bo-Anne Bělková (studentka postgraduálního studia) se věnuje především analýze obrazu pro účely hodnocení jakosti potravin, zejména masa a masných výrobků. Od února 2009 nastupuje jako vědecký pracovník v oboru technologie masa se zaměřením na udržitelnost a chemické změny při výrobě, skladování a distribuci.

Ing. Jan Rosmus, absolvent VŠCHT Praha a posgraduálního studia 1. atestace na Vysoké škole veterinární v Košicích a 2. atestace na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně. Je vedoucím oddělení chemie Státního veterinárního ústavu Praha a národních referenčních laboratoří pro pesticidy a polycyklické aromatické uhlovodíky. V ústavu vede monitoring reziduí a určených látek dle Rozhodnutí Rady 96/23/ES a je spoluautorem plánu tohoto monitoringu pro jednotlivá léta.